

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2005年9月1日 (01.09.2005)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 2005/080980 A1

(51) 国际分类号⁷: G01N 33/53, C12Q 1/00

(21) 国际申请号: PCT/CN2004/000134

(22) 国际申请日: 2004年2月20日 (20.02.2004)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 北京新景安太
医疗技术服务有限公司(BEIJING XINJING ANTAI
MEDICAL AND TECHNOLOGY SERVICE
LIMITED CORP.) [CN/CN]; 中国北京市海淀区中关
村甲334号楼1门401号, Beijing 100080 (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 陈凤林(CHEN, Fenglin)
[CN/CN]; 中国北京市朝阳区东三环中路18号, Beijing
100022 (CN)。

(74) 代理人: 北京市金杜律师事务所(KING & WOOD
PRC LAWYERS); 中国北京市朝阳区东三环中路39
号建外SOHO A座31层, Beijing 100022 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护):
AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,
PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护):
ARIPO(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ,
MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI(BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG)

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期
PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: A METHOD FOR DIAGNOSING IMMUNITY RECURRENT SPONTANEOUS ABORTION AND
METHOD FOR TREATING AND MONITORING

(54) 发明名称: 免疫性反复自然流产的诊断方法和治疗监测方法

(57) Abstract: The invention discloses a method for diagnosing immunity recurrent spontaneous abortion, which comprising detecting the level of antinuclear antibody of patients humor in vitro and comparing with the level of control women. In the method of the invention, especially using no2 chromosome separated from male or fragment comprising fibronectin encoding gene as antigen, to detect the level of antinuclear antibody of patients humor sample. The invention also discloses a kit used for diagnosing immunity recurrent spontaneous abortion, and kit used for monitoring therapeutics effect of immunity recurrent spontaneous abortion.

(57) 摘要

本发明公开了一种诊断免疫性反复自然流产的方法, 其中在体外测定患者体液中抗核抗体的水平, 并与正常人的相应抗核抗体水平比较。本发明的方法特别利用来自男性个体的分离的2号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段作为抗原, 测定患者的体液样品中相应抗核抗体水平。还公开了免疫性反复自然流产的诊断试剂盒、以及用于监测免疫性反复自然流产治疗效果的方法和试剂盒。

免疫性反复自然流产的诊断方法和治疗监测方法

技术领域

本发明涉及一种反复自然流产的诊断和治疗监测方法。

5

背景技术

流产指妊娠 28 周前，胚胎及其附属物被孕妇体内排除的现象。反复自然流产（recurrent spontaneous abortion, RSA）是指连续 2 次以上在接近同一妊娠周发生胎停育继而流产的现象。在孕妇中反复自然流产的发病率为 2-3%。根据流产发生的时间，可分为早期反复自然流产（12 周之前）和晚期反复自然流产（12 周之后）；根据流产前有无正常怀孕史，可分为原发性反复自然流产和继发性反复自然流产。临床上将两种分类结合起来，将 RSA 分为：早期原发 RSA，晚期原发 RSA，早期继发 RSA 和晚期继发 RSA。

10

15

20

多种病因可以引起反复自然流产，其中有染色体异常、内分泌失调、生殖器官解剖结构异常、细菌或病毒感染、母婴血型不合、环境污染等。但还有一半左右的反复自然流产没有明确病因，被称为不明原因的反复自然流产（unexplained RSA）。近年来随着对生殖免疫机制认识的深入，以及免疫学检查方法的进步，免疫因素被认为是不明原因反复自然流产的主要病因[Ksouri H, Zitouni M, Achour W, Makni S, Ben Hassen A., Recurrent pregnancy loss related to immune disorders, Ann Med Interne (Paris). 2003 Sep;154(4):233-47.]。与免疫因素有关的 RSA 被称为免疫性 RSA。

25

关于引起 RSA 的免疫学机制，几种代表性观点如下：（1）夫妇 HLA 的相容性高（increased sharing of human leukocyte antigens (HLA)），抑制母体产生抗配偶的细胞毒性抗体（anti-paternal cytotoxic antibodies, APCA）、抗个体基因型抗体（anti-idiotypic antibodies, Ab2）、混合淋巴细胞反应阻断抗体（mixed lymphocyte reaction blocking antibodies, MLR-Bf）等，这些抗体可以阻止母亲免疫系统

对胚胎的攻击，统称为封闭抗体（blocking antibodies,BA）；（2）辅助T细胞1（Th1）来源的细胞因子和自然杀伤细胞的（natural killer cells, NK）过度活化（Overactivity of T helper-1 (Th-1) cytokines）；（3）抗磷脂抗体（antiphospholipid antibodies APA）水平的异常增高，抗磷脂抗体是一组自身免疫性抗体，其中包括抗心磷脂抗体、狼疮抗凝抗体(lupus anticoagulants and anticardiolipin [aCL] antibodies)等。

关于免疫性RSA的治疗方法，现在应用比较广泛的是淋巴细胞免疫治疗。自Taylor和Faulk于1981年首次给不明原因RSA患者输取自配偶的混合白细胞悬液后，该免疫治疗在国内外均已开展[Gatenby PA, Cameron K, Simes RJ. Treatment of recurrent spontaneous abortion by immunization with paternal lymphocytes: results of a controlled trial. Am J Reprod Immunol. 1993 Mar;29(2):88-94.]。免疫原多采用配偶的淋巴细胞。方法为：从配偶的静脉血中分离提取淋巴细胞，皮内注射；也可以用丈夫的浓缩白细胞或全血进行静脉注射；或先用200radX线照射灭活细胞再行皮内注射，以减少抗宿主反应。通常在妊娠前免疫2~4次，每次间隔2周，妊娠第6周前后加强免疫1~3次。在淋巴细胞免疫治疗RSA开展20年后的今天，经国内外学者的大量研究，发现该治疗方法所应用的患者不明确，即病因、诊断和分类都不清楚，治疗机理不明，治疗效果不确定，副作用大，因此必需谨慎使用[Charles A. Omwandho, Hans R. Tinneberg, Aloys G. Tumbo-Oeri, Timothy K. Roberts, John Falconer, Recurrent Pregnancy Losses and the Role of Immunotherapy. Review Article, Arch Gynecol Obstet (2000) 264:3-12]。

本发明人对母体胎儿间免疫相容机制和病理妊娠的免疫学发病机制进行了深入研究，发现了不明原因早期继发RSA的病因和病理学改变，在此基础上创立了一种高效、安全的RSA免疫治疗方法，见同一申请人在同日提交的另一份PCT申请中提出的基因疫苗疗法。该治疗方法经临床试用共治疗300余例患者，治愈率超过95%，至今未发现副作用。

由于该基因疫苗疗法只对免疫性 RSA 有效, 因此, 为了提高治疗的针对性和治疗效率, 需要一种快速、简便的免疫性 RSA 诊断方法。另外, 在免疫性 RSA 的治疗过程中, 需要一种监测治疗效果的方法, 以确定安全受孕的时间, 并保证妊娠安全渡过既往流产发生时期。

5 抗核抗体(antinuclear antibody, ANA)是抗核酸和核蛋白抗体的总称, 泛指血清中抗各种细胞核成分的抗体, 广泛存在于自身免疫性疾病中。因此检查 ANA 是诊断自身免疫性疾病实验室检查的主要项目之一, 用于诊断系统性红斑狼疮、干燥综合症等。

10 现在常用的抗核抗体检验方法包括间接免疫荧光、酶联免疫吸附实验(ELISA)等, 抗原为猴肝、HEP-2 细胞或纯化的多种核抗原等。

发明概述

为了快速诊断免疫性 RSA, 以及监测免疫治疗的效果, 本发明提供:

15 (1) 一种用于诊断免疫性反复自然流产的方法, 其特征在于体外测定患者体液样品中抗核抗体的水平, 并与正常人的相应抗核抗体水平比较。

20 (2) 上述(1)的诊断方法, 其中将来自多个男性个体的分离的 2 号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段的混合物作为抗原, 测定患者的体液样品中相应抗核抗体水平。

 (3) 上述(1)的诊断方法, 其中将来自患者配偶的分离的 2 号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段作为抗原, 测定患者的体液样品中相应抗核抗体水平。

25 (4) 一种用于诊断免疫性反复自然流产的试剂盒, 其中含有作为抗原的来自男性个体的 2 号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段。

 (5) 上述(4)的试剂盒, 其中所述男性个体是所述患者的配偶。

 (6) 上述(4)的试剂盒, 其中所述男性个体是多个任意男性个体。

(7) 上述 (4) - (6) 的试剂盒, 其中所述抗原包被在固相载体上。

(8) 上述 (4) - (7) 的试剂盒, 其中还包含酶标二抗、必要的缓冲液和操作说明。

5 (9) 一种监测免疫性反复自然流产治疗效果的方法, 其特征在于体外测定治疗后患者体液样品中抗核抗体的水平, 并与治疗前的水平相比较。

10 (10) 一种用于监测免疫性反复自然流产治疗效果的试剂盒, 其中含有作为抗原的来自男性个体的分离的 2 号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段。

发明详述

15 本发明人对早期继发RSA进行了临床流行病学研究, 发现在多种相关因素中人流与早期继发RSA的相关性最高, 并且其中大多数继发自然流产发生的妊娠周与人流的妊娠周相同或相近, 与对照组相比具有显著的统计学差异 (结果见表1)。因此, 本发明人推测人流是早期继发RSA的诱因。

表1 早期继发RSA的流行病学调查

项目	病例数 (N)	人流		时间一致	
		例数	百分比 (%)	例数	百分比 (%)
RSA	35	32	91	30	86
对照	140	28	20	—	—
χ^2		52.4			
P		<0.01			

20

为了探询早期继发 RSA 的发病机制, 本发明人对有人流病史的早期继发 RSA 患者的再次怀孕进行监测, 当发现胚胎停育后, 通过药物流产获得具有完整胎盘绒毛的 RSA 胚胎标本。无反复自然流产

患者药物流产所获得的胚胎标本作为对照。对所获得的胚胎绒毛组织进行显微水平和超微水平的观察，并进行免疫组化研究。结果发现，在光镜下这两种绒毛结构没有差别，但在电镜下，对照标本的滋养层细胞外有一层致密的蛋白网结构，而 RSA 患者标本的滋养层细胞是裸露的（结果见图 1 和图 2）。免疫组化显示，对照标本的滋养细胞层与蜕膜之间存在纤连蛋白带，并且滋养细胞之间也存在纤连蛋白带，而 RSA 患者标本的滋养层细胞外没有纤连蛋白。因此本发明人认为滋养细胞层外的纤连蛋白带是构成胎盘免疫屏障的主要结构，该纤连蛋白带缺失所导致的免疫屏障功能破坏是免疫性 RSA 的病因。

为了研究免疫性 RSA 患者滋养细胞层外的纤连蛋白带缺陷的原因，本发明人用检测纤连蛋白抗体的试剂盒检测了 30 例有人流病史的早期继发 RSA 患者血清中的抗 FN 抗体，结果与对照组相比无统计学差异。但令人惊异的是，本发明人发现这些患者血清中抗 2 号染色体（含 FN 编码基因）的抗核抗体水平（按实施例 2 所述方法测定）与对照组相比明显升高（见表 2）。

因此本发明人对免疫性 RSA 的发病机制提出如下假说：在对妊娠进行人工干预例如人工流产的过程中，胚胎细胞破裂，配偶来源的处于表达状态的 FN 编码基因作为抗原被递呈给母体的免疫系统，产生抗 FN 编码基因的抗核抗体。与同一配偶再次怀孕时，抗 FN 编码基因的抗核抗体进入滋养细胞，与处于表达状态的 FN 基因结合，封闭该基因，使胚胎滋养层细胞外的纤连蛋白不能正常形成，胎盘免疫屏障的完整性被破坏，从而母体对胚胎产生排斥反应，胚胎停止发育，流产发生。

FN 是一种大分子多功能糖蛋白，存在于结缔组织、细胞表面、细胞浆和其它体液中。已有研究发现胚胎滋养细胞外存在 FN 带，但认为它仅在胎盘与蜕膜的连接[Ronald F. Feinberg, Harvey J. Kliman, and Charles J. Lockwood, Is Oncofetal Fibronectin a Trophoblast Glue for Human Implantation? American Journal of Pathology, Vol. 138, No. 3, March 1991]、滋养细胞在蜕膜中的移动和侵袭中起作用[Chakraborty

C, Gleeson LM, McKinnon T, Lala PK., Regulation of human trophoblast migration and invasiveness. Can J Physiol Pharmacol. 2002 Feb; 80(2):116-24. Review.]. 还有研究认为检测孕妇宫颈分泌物中的 FN 水平能够预测早产 [Koenn ME., Fetal fibronectin, Clin Lab Sci. 2002 Spring;15(2):96-8, 115]。但现有技术对于 FN 在胚胎免疫屏障中的作用没有明确的认识。1995 年通过放射自显影技术证实了人类 FN 基因位于 2 号染色体长臂 3 区 4 带 (2q34)。

本发明人在上述对免疫性 RSA 发病机制的研究基础上, 进行了进一步的深入研究, 试图寻找对免疫性 RSA 的有效治疗方法。结果惊人地发现, 给免疫性早期继发 RSA 患者怀孕前注射配偶来源的含 FN 编码基因的 2 号染色体, 可以有效地降低患者外周血中抗 2 号染色体的抗核抗体水平 (表 2)。更令人惊异的是, 通过孕前和/或孕中显著降低所述抗核抗体水平并在一定时期内维持在一个妊娠安全水平, 可以使免疫性 RSA 患者正常妊娠和生育。

表 2 治疗前后免疫性 RSA 患者血清抗核抗体水平的变化

	人数	外周血抗核抗体平均值	组间差异
染色体治疗前	35	1: 254.7	
染色体治疗后	35	1: 34.6	
对照组	45	1: 38.9	P<0.01

从而证明免疫性 RSA 患者体内的抗核抗体水平与免疫性 RSA 的发生具有直接相关性。

因此, 本发明提供一种通过体外测定患者体液样品中抗核抗体水平来诊断免疫性反复自然流产的方法和试剂盒, 以及一种通过体外测定治疗后患者体液样品中抗核抗体水平来监测免疫性反复自然流产治疗效果的方法和试剂盒。

本发明所述下列概念具有如下含义:

个体 (患者): 指包括人的任何哺乳动物雌性个体。

配偶: 指 RSA 个体的流产妊娠的性伙伴。

2号染色体:指人的2号染色体或其他哺乳动物中含FN编码基因的类似染色体。对后一种情况而言,所述染色体在动物染色体组中的编号不一定是2号,只要其含有FN编码基因即可。

5 抗核抗体:指抗各种细胞核成分的抗体,特别是按类似于实施例2的方法测定的抗体。

免疫性RSA:指血清中抗核抗体滴度大于1:64的早期继发性反复自然流产。

抗体滴度(水平):指按ELISA法测定抗体阳性的样品血清的最大稀释度。

10 妊娠安全水平:指比RSA患者原抗核抗体水平降低至少约30%、优选至少约40%、更优选至少约50%、60%、70%或以上的抗核抗体水平,或者指抗体滴度小于约1:64。

15 分离的:指2号染色体与其他细胞物质(包括蛋白质、其他染色体等)相分离。以干物质计,优选其它细胞物质的含量在10wt%以下,优选其他细胞物质的含量在10wt%以下,更优选在5%、4%、3%、2%、甚至1wt%以下。优选其他染色体的含量<10%,更优选<1%。

染色体片段:含纤连蛋白的编码基因并保留降低本发明抗核抗体水平之活性的2号染色体的片段。

20 如上所述,本发明涉及一种用于诊断免疫性反复自然流产的方法,其特征在于体外测定患者体液样品中抗核抗体的水平,并与正常人的相应抗核抗体水平比较。

25 在本发明诊断方法的一个优选实施方案中,将来自多个男性个体的分离的2号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段的混合物作为抗原,测定患者的体液样品中相应抗核抗体水平。所述多个男性个体指例如3个以上正常男性,优选5个以上,更优选10个以上,更优选20个以上,最优选30个以上正常男性。

在本发明诊断方法的另一实施方案中,将来自患者配偶的分离的2号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段作为抗原,测定患者的体液样品中相应抗核抗体水平。

相应地，本发明涉及一种用于诊断免疫性反复自然流产的试剂盒，其中含有作为抗原的来自男性个体的 2 号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段。

在本发明试剂盒的一个实施方案中，其包含作为抗原的来自所述患者配偶的 2 号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段。

在本发明试剂盒的一个优选实施方案中，其中含有作为抗原的来自多个任意男性个体的 2 号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段，例如来自 3 个以上正常男性个体，优选 5 个以上，10 个以上，更优选 20 个以上，最优选 30 个以上正常男性个体。

本发明的试剂盒中，优选所述抗原包被在固相载体上。所述固相载体可以是免疫试验中常用的任何固相载体，例如塑料微滴定板。

在本发明的一个特别优选的实施方案中，所述试剂盒中还包含酶标二抗、必要的缓冲液和操作说明。

用来测定患者抗核抗体水平的样品可以是患者任何种类的体液、分泌物、血液等，优选外周血。

检测抗体水平的方法可以是本领域技术人员熟知的任何有关方法，优选间接酶联免疫吸附实验（ELISA）。其中抗原优选是来自多名普通男性个体的 2 号染色体或含有纤连蛋白编码基因的染色体片段的混合物，例如来自 30 名男性个体。用本领域技术人员熟知的方法以抗原包被固相载体。将待测样本等比例稀释（ $>1:32$ ），优选稀释度为 $1:64$ 到 $1:1024$ 。37℃ 下反应 20 到 40 分钟，优选 30 分钟。二抗为抗人 IgG 抗体，可以来自于大鼠、小鼠、山羊、兔等，标记二抗的酶可以是辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、超氧化物歧化酶等中的任一种。显色剂为任何不产生沉淀的酶作用底物，优选 TMD（3,3',5,5'-四甲替联苯胺）和 ABST。结果可以用肉眼直接观察，也可以用酶标仪测量 OD 值。当血清稀释比例 $>1:64$ 仍为阳性时，有临床诊断意义。

RSA 的治疗方法例如为：按常规方法从患者配偶的外周血细胞分离 2 号染色体或其片段并与无菌注射用水或生理盐水等载体混合制成溶液。溶液中染色体的浓度例如约 10 条染色体/油镜视野。将该溶液表

皮下注射给患者，每次注射0.5到2ml，每个疗程通常注射3到5次，优选4次，30天内完成。一个疗程结束后，测定外周血抗核抗体的水平，如果降至妊娠安全范围即可受孕。例如一个疗程后抗核抗体妊娠安全水平可以保持约3个月，在此期间可以安全受孕。

5 注射配偶基因疫苗后，可以通过测定患者特定抗核抗体水平的变化来评价治疗效果，并指导受孕的适宜时间。当抗核抗体水平下降至低于治疗前至少约 30%，优选至少约 40%，更优选至少约 50%的水平时，或者指抗体滴度小于约 1: 64 时，为安全受孕范围，可以正常怀孕。怀孕后，一般继续一个基因疫苗疗程，同时监测患者的抗核抗体水平，使之保持在正常范围，使妊娠安全渡过既往流产期。

10 因此，本发明还涉及一种监测免疫性反复自然流产治疗效果的方法，其特征在于体外测定治疗后患者体液样品中抗核抗体的水平，并与治疗前的水平相比较。

相应地，本发明还涉及一种用于监测免疫性反复自然流产治疗效果
15 的试剂盒，其中含有作为抗原的来自男性个体的分离的 2 号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段。

上述关于本发明诊断方法和试剂盒的描述和优选条件同样适用于本发明的治疗效果监测方法和试剂盒。

20 利用本发明的诊断方法并结合病史诊断了300例免疫性RSA患者。对她们注射配偶2号染色体制剂进行免疫治疗后，治愈率达95%。因此，抗核抗体的检测为免疫性RSA的确定提供了客观、准确的诊断标准。

下面结合附图和具体实施例进一步描述本发明，但本发明的范围并不受这些附图和实施例的限制。

25

附图简述

图1. 电镜观察显示正常对照胎盘标本的滋养层细胞外有一层致密的蛋白网结构。

图2. 电镜观察显示RSA患者胎盘标本的滋养层细胞是裸露的。

本发明的具体实施方案

实施例 1

早期继发RSA胚胎绒毛外纤连蛋白带的缺失

5 (1) 对有人流病史的早期继发RSA患者再次怀孕进行监测, 当发现胚胎停育后, 通过药物流产获得具有完整胎盘绒毛的RSA胚胎标本。

(2) 无反复自然流产病史的患者药物流产所获得的胚胎标本作为对照。

10 (3) 将胚胎标本用中性10%福尔马林固定、脱水、石蜡包埋, 切成4~5 μm厚的组织切片, HE染色, 光学显微镜下观察。发现两种胚胎组织的镜下结构没有明显差异。

(4) 将所获得的新鲜胚胎标本用2.5%戊二醛固定, 常规方法制成电镜切片, 透射电镜观察。发现对照标本的滋养层细胞外有一层致密的蛋白网结构, 但RSA患者标本的滋养层细胞是裸露的。结果见图1和图2。

15 (5) 用鼠抗人FN单克隆抗体(购自DAKO公司, 1:50专用抗体稀释液稀释), 以DAB为显色底物, 常规免疫组化方法检测两种胚胎标本纤连蛋白的表达。结果显示对照标本的滋养细胞层与蜕膜之间存在纤连蛋白带, 并且滋养细胞之间也存在纤连蛋白带; 而RSA患者标本的滋养层细胞外纤连蛋白带缺失。

实施例2

测定早期继发RSA患者外周血抗核抗体的水平

25 (1) 制备来自多名普通男性个体的2号染色体混合物, 男性个体数通常>20名。

(2) 用包被缓冲液(0.05M碳酸钠缓冲液, PH9.6)稀释2号染色体混合物至浓度为10条染色体/油镜视野, 包被聚苯乙烯微量塑料板(酶标板)。

(3) 向每个反应孔中加入用稀释缓冲液(含0.1%牛血清白蛋白的PBS缓冲液(PH7.4))按不同比例(1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024)稀释的患者血清稀释液50微升, 37℃下反应30分钟, 用PBS缓冲液(PH7.4)洗涤2次。

5 (4) 向每个反应孔中加入辣根过氧化物酶标记的鼠抗人IgG抗体(购自DAKO公司)50微升, 37℃反应30分钟, 然后用PBS缓冲液(PH7.4)洗涤2次。

(5) 向每个反应孔中加入常规方法新鲜配制的TMB(3,3',5,5'四甲替联苯胺)底物溶液0.1ml, 37℃反应10到30分钟。

10 (6) 用酶标仪读取每个反应孔的OD值, 以测定抗核抗体水平; 或者以肉眼可观察到显色反应的血清最大稀释度确定抗核抗体的滴度。

当血清稀释比例>1:64时仍有显色反应的视为阳性, 有临床意义。

15 实施例3

诊断、治疗病例1

患者就诊时已结婚17年。1982~1996年间第1、2次怀孕均在孕8周时行人工流产终止妊娠。1999年第3次怀孕准备生育, 但在孕8周时腹痛后阴道出血, B超提示胎停育, 继而流产。此后人工避孕。通过
20 检查排除可能引起不孕的其它病因。治疗前按实施例2的方法测定的外周血抗核抗体水平为1:128。

在1999年12月7日、2000年1月14日、2000年1月20日和2000年1月28日对患者分别4次皮下接种来自其配偶的纯化2号染色体溶液。前三次接种后皮肤局部反应强度为++++, 第四次反应强度为++。第四次
25 治疗后按实施例2的方法测定的患者外周血抗核抗体水平为1:32。

患者于2001年8月分娩一个2800克重的健康男婴。

实施例4

诊断、治疗病例2

就诊时患者结婚4年。1995年首次怀孕，在孕7周左右行人工流产终止妊娠。1996年8月第2次怀孕，准备生育，但在孕7周时腹痛后阴道出血，B超提示胎停育，继而完全流产；1997年1月和1997年6月第3、4次怀孕，分别在孕8周和孕7周时阴道出现血性分泌物，曾用含黄体酮的中药治疗，出血停止，孕10周时B超提示胎停育，行药物流产，胚胎相当于8周。1997年7月后工具避孕至今。治疗前外周血特定抗核抗体水平为1: 1024。

在1999年6月25日、1999年7月12日、1999年7月28日和1999年8月12日对患者分别进行4次皮下接种来自其配偶的纯化2号染色体溶液。前三次接种后皮肤局部反应强度为++++，第四次反应强度为++。第四次治疗后按实施例2的方法测定的患者外周血抗核抗体水平为1: 64。

患者于2000年5月分娩一个3000克重的健康男婴。

实施例5

诊断、治疗病例3

患者就诊时已结婚5年。1993~1995年间第1、2次怀孕均在孕7周时行人工流产终止妊娠。1996年第3次怀孕准备生育，但在孕8周时腹痛后阴道出血，B超提示胎停育，继而流产。1997~1998年间共怀孕两次，均在孕7周时出现阴道血性分泌物。曾用黄体酮中药保胎治疗，出血停止。孕10周时B超提示胎停育，行药物流产，胚胎相当于7周；1998年1月后至治疗前人工避孕。治疗前按照实施例2的方法测定外周血抗核抗体水平为1: 128。

在1998年9月6日、1998年9月12日、1998年9月25日和1998年10月19日对患者分别4次皮下接种来自其配偶的纯化2号染色体溶液。前三次接种后皮肤局部反应强度为++++，第四次反应强度为++。第四次治疗后按实施例2的方法测定的患者外周血抗核抗体水平下降至1: 64。

患者于1999年9月分娩一个2800克重的健康男婴。

权 利 要 求

1、一种用于诊断免疫性反复自然流产的方法，其特征在于体外测定患者体液样品中抗核抗体的水平，并与正常人的相应抗核抗体水平比较。

2、根据权利要求 1 的诊断方法，其中将来自多个男性个体的分离的 2 号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段的混合物作为抗原，测定患者的体液样品中相应抗核抗体水平。

3、根据权利要求 2 的诊断方法，其中所述多个男性个体是至少 3 个男性个体。

4、根据权利要求 3 的诊断方法，其中所述多个男性个体是至少 10 个男性个体。

5、根据权利要求 4 的诊断方法，其中所述多个男性个体是至少 20 个男性个体。

6、根据权利要求 1 的诊断方法，其中将来自患者配偶的分离的 2 号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段作为抗原，测定患者的体液样品中相应抗核抗体水平。

7、一种用于诊断免疫性反复自然流产的试剂盒，其中含有作为抗原的来自男性个体的 2 号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段。

8、根据权利要求 7 的试剂盒，其中所述男性个体是所述患者的配偶。

9、根据权利要求 7 的试剂盒，其中所述男性个体是多个男性个体。

10、根据权利要求 9 的试剂盒，其中多个男性个体是至少 3 个男性个体。

11、根据权利要求 10 的试剂盒，其中多个男性个体是至少 10 个男性个体。

12、根据权利要求 11 的试剂盒，其中多个男性个体是至少 20 个

男性个体。

13、根据权利要求 7 的试剂盒，其中所述抗原包被在固相载体上。

14、根据权利要求 13 的试剂盒，其中还包含酶标二抗、必要的缓冲液和操作说明。

5 15、一种监测免疫性反复自然流产治疗效果的方法，其特征在于体外测定治疗后患者体液样品中抗核抗体的水平，并与治疗前的水平相比较。

16、一种用于监测免疫性反复自然流产治疗效果的试剂盒，其中含有作为抗原的来自男性个体的分离的 2 号染色体或其含有纤连蛋白
10 编码基因的片段。

17、根据权利要求 16 的试剂盒，其中所述男性个体是所述患者的配偶。

18、根据权利要求 16 的试剂盒，其中所述男性个体是多个男性个体。

15

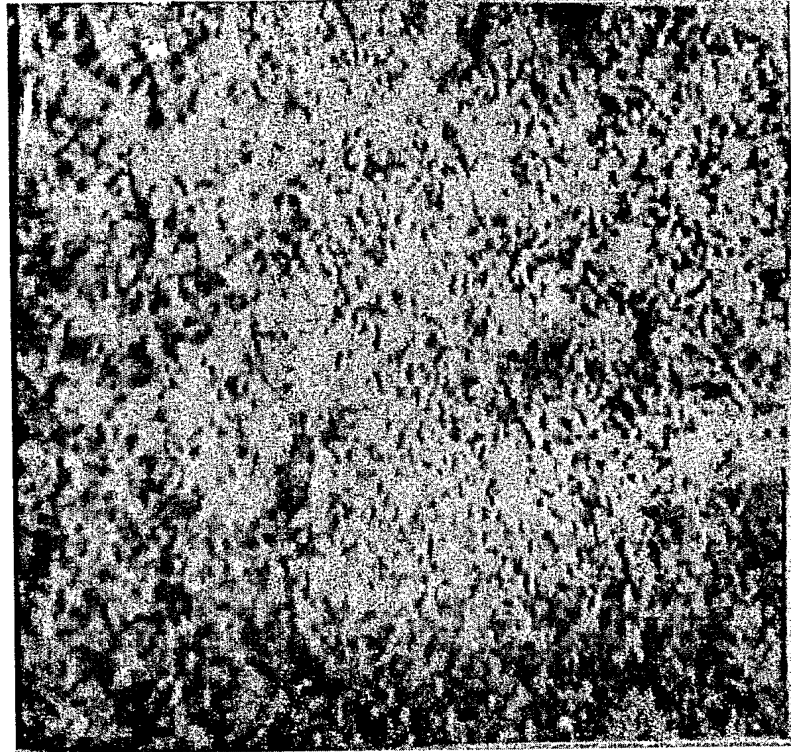


图 1

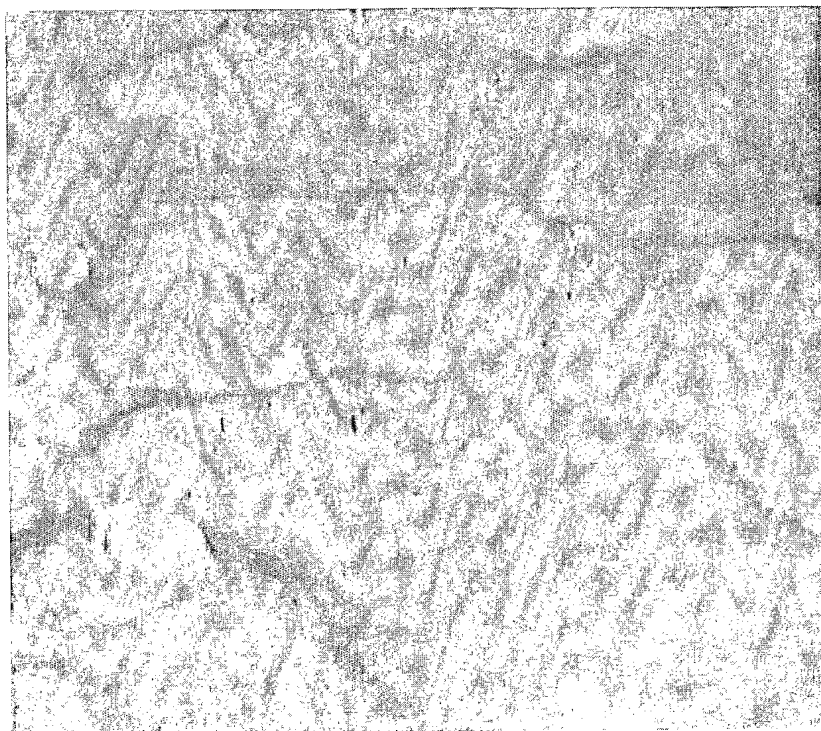


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2004/000134

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/53,C12Q1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N,C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

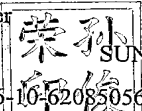
CNPAT,WPI,EPODOC,PAJ,NPL:antinuclear antibody(ANA),fibronectin(FN), recurrent spontaneous abortion(RSA),abortion,misscarrage,chromosome,chromosomal,detection

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Ogasawara,Mayumi;Aoki,Koji etal "Clinical significance of $\beta 2$ glycoprotein I dependent Anticardiolipin antibody,lupus anticoagulant and antinuclear antibodies in patients with Recurrent miscarriages." REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY OCT.1998,pages272-276 See the abstract	7-14,16-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 26.MAR.2004(26.03.2004)	Date of mailing of the international search report 29 · APR 2004 (29 · 04 · 2004)
Name and mailing address of the ISA/ 6 xitucheng Rd., Jimen Bridge,Haidian District, 100088 Beijing,China Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer  SUN,Junrong Telephone No. 86-10-62085056

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2004/000134

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO0242769A1 30.MAY.2002(30.05.2002) See all the document ,especially abstract	7-14,16-18
A	KANO,TAKASHI ETAL "The incidence of endometriosis and adenomyosis in patients with Habitual abortion in relation to immunological abnormalities." 1997,42(2),pages 113-118 See the abstract	7-14,16-18
A	JP9218202A 19.AUG.1997(19.08.1997) See all the document, especially abstract	7-14,16-18
A	DE2836362A 6.MAR.1980(06.03.1980) See the abstract	7-14,16-18
A	WO8300877A1 17.MAR.1983(17.03.1983) See the abstract	7-14,16-18
A	US5468619A 21.NOV.1995(21.11.1995) See all the document	7-14,16-18
A	US5281522A 25,JAN.1994(25.01.1994) See all the document	7-14,16-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2004/000134

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:1-6,15
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-6 relate to a method for diagnosing immunity recurrent spontaneous abortion,claim 15 relate to a method for monitoring therapeutics effect of immunity recurrent spontaneous abortion.All of the preceding claims relate to methods for the diagnosis or for the treatment of diseases ,therefore not required to be searched by this Authority.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant,this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant.Consequently ,this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2004/000134

A. 主题的分类

IPC 7 G01N33/53,C12Q1/00

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

G01N,C12Q,

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNPAT,WPI,EPODOC,PAJ,NPL:antinuclear antibody(ANA), fibronectin(FN),recurrent spontaneous abortion(RSA),abortion,miscarriage,chromosome,chromosomal,detection

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	Ogasawara,Mayumi;Aoki,koji 等 “Clinical significance of $\beta 2$ glycoprotein I dependent anticardiolipin antibody,lupus anticoagulant and antinuclear Antibodies in patients with recurrent miscarriages.” REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY 1998 年 10 月, 272-276 页 参见摘要	7—14, 16—18
A	WO0242769A1 30.5 月 2002 (30.05.2002) 全文, 尤其摘要	7—14, 16—18

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期
26.3 月 2004 (26.03.2004)

国际检索报告邮寄日期
29.4 月 2004 (29.04.2004)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088
传真号: (86-10)62019451

授权官员
荣孙印像
电话号码: (86-10)62085056

C(续). 相关文件

类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	KANO,TAKASHI 等 “The incidence of endometriosis and adenomyosis in Patients with habitual abortin in relation to immunological abnormalities.” NIPPON FUNIN GAKKAI ZASSHI 1997,42(2),113-118 参见摘要	7-14, 16-18
A	JP9218202A 19.8 月 1997 (19.08.1997) 参见全文, 尤其摘要	7-14, 16-18
A	张少波 “抗核抗体的检测方法及其临床意义” 肾脏病与透析肾移植杂志 1995 年 10 月, 第 4 卷, 第 5 期, 495-497 参见全文	7-14, 16-18
A	DE2836362 6.3 月 1980 (06.03.1980) 参见摘要	7-14, 16-18
A	WO8300877A1 17.3 月.1983 (17.03.1983) 参见摘要	7-14, 16-18
A	US5468619A 21.11 月 1995 (21.11.1995) 参见全文	7-14,16-18
A	US5281522A 25.1 月 1994 (25.01.1994) 参见全文	7-14,16-18

第II栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第1页第2项)

按条约17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

1. ☒ 权利要求: 1-6, 15

因为它们涉及到不要求本国际检索单位进行检索的主题, 即:

权利要求1-6要求保护一种用于诊断免疫性反复自然流产的方法, 权利要求15要求保护一种监测免疫性反复自然流产治疗效果的方法, 上述权利要求是在人体或动物体上实施的诊断方法, 属于不需要国际检索单位进行检索的主题。

2. ☐ 权利要求:

因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:

3. ☐ 权利要求:

因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第II栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说, 是权利要求:

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首次提及的发明; 包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明: ☐ 申请人的异议书随附加检索费同时提交。

☐ 支付附加检索费时未提交异议书。